





دانشگاه سوادکوه

دانشکده کشاورزی

گروه علوم باغبانی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc)

در رشته علوم باغبانی

بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های امیدبخش گردو در استان زنجان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

تحقیق و نگارش:

زهرا سفیدکوهی

اساتید راهنما:

دکتر علی سلیمانی

دکتر حسین جعفری

استاد مشاور:

دکتر مهدی طاهری

پاییز ۱۳۹۱

تقدیم به

پدر و مادرم

آن دو فرشته ای که از خواسته هایشان گذشتند، سختی ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای

مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم.

به همسرم

که سایه مهربانیش سایه سار زندگی می باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را

برایم تسهیل نمود.

حمد و سپاس بی‌پایان خدایی را که به انسان کرامت بخشید و بر او علمی آموخت که به فرشتگانش نیز نیاموخته بود تا این علم زینت‌بخش اعمال او شود و همانند چراغی راهی را که انسان بر اساس فطرت برای رسیدن به کمال مطلق الهی به آن رهنمون می‌گردد را روشن نماید.

بر خود لازم می‌دانم از اساتید ارجمندم آقایان دکتر سلیمانی و دکتر جعفری و دکتر طاهری برای راهنمایی، مشاوره و هدایت این پایان‌نامه و همچنین از اساتید عزیز آقایان دکتر امیری، دکتر ربیعی و دکتر مرتضوی که در این مقطع افتخار شاگردیشان را داشتم خاضعانه سپاسگزارم.

از مجموعه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان بخصوص آقای مهندس دستکار و مجموعه جهاد کشاورزی استان زنجان بخصوص آقای مهندس اسکندری بابت همکاری‌ها و زحماتشان صمیمانه تشکر می‌کنم.

از دوستان عزیزم بخصوص خانم فائزه جمشیدی بابت دلگرمی‌ها و زحمات بی‌دریغش تشکر و قدردانی می‌کنم.

چکیده

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) یکی از منابع ارزشمند گیاهی جهان و به‌ویژه ایران است. به منظور تمایز و گروه‌بندی ۲۱ ژنوتیپ گردو موجود در مجتمع کشت و صنعت خرمدره واقع در استان زنجان از ۱۳ نشانگر ملکولی ریزماهواره (SSR) استفاده شد. DNA استخراج شده از نمونه‌های گیاهی بوسیله آغازگرهای ریزماهواره تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قرار گرفته و محصولات این واکنش‌ها روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد استاندارد، الکتروفورز شدند. در مجموع ۳۷ آلل با میانگین ۲/۸۴ در هر جایگاه شناسایی شد. بیشترین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و قدرت تفکیک (D) مربوط به جایگاه WGA276 بود. تجزیه‌های توصیفی ملکولی نشان داد که از بین نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این مطالعه جایگاه‌های WGA276 و WGA071 به ترتیب از بالاترین و کمترین توانایی در تمایز ژنوتیپ‌های مورد مطالعه برخوردارند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، گردو، نشانگرهای ریزماهواره

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول

۲.....	مقدمه و کلیات
۳.....	تاریخچه و منشای گردو
۴.....	گیاه شناسی
۴.....	اکولوژی مناسب گردو
۵.....	ازدیاد گردو
۶.....	ترکیبات و موارد استفاده
۷.....	ارقام و ژنوتیپ‌های برتر گردو در جهان و ایران
۷.....	پراکنش گردو در جهان
۸.....	پراکنش گردو در ایران
۸.....	سطح زیر کشت و تولید گردو در جهان و ایران
۱۱.....	نشانگر چیست؟
۱۱.....	انواع نشانگرهای ژنتیکی
۱۱.....	نشانگرهای مرفولوژیک
۱۲.....	نشانگرهای پروتئینی
۱۲.....	نشانگرهای ملکولی DNA
۱۳.....	نشانگرهای مبتنی بر PCR
۱۴.....	نشانگرهای غیر مبتنی بر PCR

۱۴	واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR).....
۱۵	ردیف‌های تکرار شونده.....
۱۵	ماهواره‌ها.....
۱۵	ماهوارک‌ها.....
۱۶	ریزماهواره‌ها.....
۱۶	توزیع ریزماهواره‌ها.....
۱۸	اهمیت ریزماهواره‌ها.....
۱۹	مزایا و معایب ریزماهواره‌ها.....
۲۱	کاربردهای نشانگرهای مولکولی.....
۲۱	تهیه نقشه‌های ژنتیکی.....
۲۱	تخمین تنوع ژنتیکی.....
۲۱	نشانمند کردن ژن‌های مهم اقتصادی.....
۲۲	انتخاب به کمک نشانگر.....
۲۲	هرم‌بندی ژن‌ها.....
۲۳	استفاده از نشانگرها در همسانه سازی یا انتقال ژن.....
۲۳	تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها.....
۲۴	آمارهای توصیفی ملکولی.....

فصل دوم

۲۷	مطالعات مبتنی بر نشانگرهای مرفولوژیکی و ریزماهواره‌ها در گردو و سایر محصولات.....
----	---

فصل سوم

- ۳۳..... مواد گیاهی
- ۳۵..... استخراج DNA
- ۳۷..... تعیین کمیت و کیفیت DNA
- ۳۸..... واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)
- ۴۰..... آغازگرها
- ۴۰..... الکتروفورز عمودی
- ۴۰..... رنگ آمیزی ژل به کمک نیترات نقره
- ۴۳..... تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

فصل چهارم

- ۴۵..... نتایج
- ۴۵..... تجزیه ریزماهواره
- ۴۶..... نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گردو بر اساس نشانگرهای ملکولی SSR
- ۴۷..... آمارهای توصیفی مولکولی

فصل پنجم

- ۵۴..... بحث
- ۵۸..... نتیجه‌گیری نهایی
- ۵۹..... پیشنهادات
- ۶۰..... فهرست منابع

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۳-۱: کد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه.....	۳۴
جدول ۳-۲: ترکیب و میزان مواد مورد نیاز در واکنش PCR.....	۳۹
جدول ۳-۳: شرایط دمایی و زمانی PCR.....	۳۹
جدول ۳-۴: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده.....	۴۱
جدول ۳-۵: مراحل رنگ آمیزی به روش نیترات نقره.....	۴۲
جدول ۴-۱: تعداد چند شکلی مشاهده شده و مورد انتظار قطعات ریزماهوره‌ای.....	۴۵
جدول ۴-۳: پارامترهای محاسبه شده برای ژنوتیپ‌های گردو به تفکیک جایگاه ریزماهوره.....	۴۹
جدول ۴-۴: پارامترهای محاسبه شده برای ژنوتیپ‌های گردو به تفکیک جایگاه ریزماهوره.....	۵۰
جدول ۴-۵: فراوانی آللی به تفکیک جایگاه در کل ژنوتیپ‌ها.....	۵۱

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۲: سطح زیر کشت و میزان تولید گردو در استان‌های مختلف کشور بر اساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی	۱۳۸۷
شکل ۱-۳: بررسی کیفیت DNA ژنومی استخراجی روی ژل آگارز یک درصد.....	۳۸
شکل ۲-۳: تصویر ژل پلی اکریل آمید با استفاده از رنگ آمیزی نیترات نقره، حاوی باندهای ریزماهواره.....	۴۲
شکل ۲-۴: هیستوگرام فراوانی‌های اللی مشاهده شده در هر مکان ژنی برای کل ژنوتیپ‌ها.....	۵۲
شکل ۱-۴: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گردو بر اساس نشانگرهای ملکولی SSR.....	۴۶

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) یکی از منابع ارزشمند گیاهی جهان و به ویژه ایران است. شناسایی، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی آن به عنوان یکی از ارزشمندترین ثروت‌های ملی کشور، از اهمیت خاصی برخوردار است (احتشام نیا و همکاران، ۱۳۸۸). با توجه به روند افزایش روزافزون جمعیت، نیاز به افزایش تولیدات کشاورزی ضروری می‌باشد. یکی از راه‌های مهم افزایش عملکرد و کیفیت هر محصول اصلاح ژنتیکی آن است که پایه و اساس این کار بررسی صفات مهم مرفولوژیکی و شناسایی ژنوتیپ‌های برتر می‌باشد. با به کارگیری نشانگرهای مولکولی این کار با سرعت و سهولت بیشتری انجام شده و موقعیت ژنتیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به هم مشخص شده و انتخاب والدین برای تلاقی‌های بعدی در برنامه‌های اصلاحی با اطمینان بیشتری صورت می‌گیرد (فتاحی مقدم و همکاران، ۱۳۸۸). نشانگرهای مولکولی خود به دو گروه پروتئین و DNA تقسیم می‌شوند. گروه نشانگرهای مولکولی DNA یک سیستم خوب تشخیص و مستقل از شرایط محیطی را ارائه کرده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

ریزماهورها یا SSR (توالی تکرار شده ساده) تکرار متوالی واحدهای مونو-دی، تری یا تترا نوکلئوتیدی هستند. معمول‌ترین آن‌ها $(A)_n$, $(TC)_n$, $(TAT)_n$, $(GATA)_n$ می‌باشد که دامنه n از چند واحد تا ده‌ها واحد است. چنین الگوهایی در یوکاریوت‌ها بسیار زیاد هستند (دوین، ۱۳۸۸).

از مزایای ریزماهورها، کاربرد و تفسیر نتایج نسبتاً ساده، سیستم چندآلی، تنوع بسیار بالا، وفور بالا در ژنوم یوکاریوت‌ها و هم‌بارز بودنشان است.

امروزه ثابت شده است که نشانگرهای SSR، نشانگرهای مناسبی برای شناسایی و تشخیص هویت ارقام می باشند و در بین نشانگرهای موجود انواع SSR جالبترین نوع برای شناسایی ژنوتیپها می باشند (Bracci et al., 2009). لذا از اهداف مطالعه حاضر می توان به موارد ذیل اشاره داشت:

- ◀ شناسایی و گروه بندی دقیق برخی از ژنوتیپهای امیدبخش گردو در استان زنجان
- ◀ استفاده از نشانگرهای ریزماهواره جهت مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی این ژنوتیپها
- ◀ انتخاب نشانگرهای ریزماهواره با قابلیت چندشکلی و تکرار پذیری بالا در ژنوتیپهای گردوی

مورد مطالعه

۲-۱- تاریخچه و منشاء گردو

تاریخچه پرورش گردو به زمان‌های خیلی گذشته برمی‌گردد. براساس گزارش اوروک (۱۹۶۹)، گردو بعد از عصر یخبندان از آسیای صغیر به مناطق مختلف دنیا انتشار یافته است. ولی اسمیت (۱۹۶۹)، بر اساس تصاویر فسیلی عقیده دارد که گردو قبل از پیدایش انسان وجود داشته‌است. در ایران قدیم گردو در معامله های فراوان به کار برده می‌شد که از این طریق به کشورهای مصر، بیزانس، ایتالیا و حتی کشورهای اروپایی و دنیای جدید انتشار یافته است (جلیلی مرنندی و حکیمی رضایی، ۱۳۷۷). تعداد زیادی درختان مسن گردو در ایران وجود دارد که عمر یکی از مسن‌ترین آن‌ها در روستایی به نام اورگن در شهرکرد ۱۴۰۰ سال تخمین زده می‌شود. در مناطق دیگر از جمله در خوانسار، اصفهان، قزوین، طالقان، کرمان و تویسرکان درختان کهنسال از ۳۰۰ تا ۷۰۰ سال مشاهده می‌شود. وجود این درختان مسن حاکی از حضور ژن‌های با ارزش مقاومت به تنش‌های متفاوت در آن‌هاست (وحدتی، ۱۳۸۲).

بیشتر دانشمندان جنگل‌های کپه‌داغ ایران را خاستگاه این گونه می‌دانند که آن را گردوی فارسی می‌نامند (وحدتی، ۲۰۰۱). ولی بررسی‌های مولکولی و ایزوآنزیمی نشان داده است که مرکز تنوع گردوی معمولی دامنه‌های شمالی رشته کوه تین‌شان واقع در استان زین‌جیانک در شمال‌غربی چین می‌باشد (وحدتی، ۱۳۸۲).

۱-۳- گیاه‌شناسی

این گیاه از تیره گردوسانان^۱ می‌باشد. برگ‌های مرکب شانه‌ای دارد و درخت یک‌پایه محسوب می‌شود. گل‌های نر آن در جانب شاخه‌های یک‌ساله و روی گل‌آذین سنبله دم‌گربه‌ای (شاتون) و گل‌های ماده آن در نوک شاخه‌های سال‌جاری در گروه‌های ۱ الی ۳ تایی و در برخی ارقام گردو در جانب شاخه‌های سال‌جاری حاصل می‌شوند. میوه‌های گردو از نوع فندقه بوده که در آن فرابر میوه چوبی شده و توسط پوست سبز که منشا برگ دارد، احاطه می‌شوند. گردوهای جوان و تازه به بار نشسته حالت ناهم‌رسی^۱ از نوع نر پیش‌رسی^۲ نشان می‌دهند. اما با بالغ شدن درخت، گل‌های نر بیشتری تشکیل می‌شود و تطابق زمانی بین مرحله گرده-افشانی و آماده بودن گل‌های ماده به‌وجود می‌آید. البته برخی از ارقام گردو ماده‌پیش‌رس^۳ هستند و توصیه می‌شود برای کاهش پدیده ناهم‌رسی، ارقام نرپیش‌رس همراه با ارقام ماده‌پیش‌رس کشت شوند. یکی از گونه‌های متداول گردو که در اکثر کشورها کشت می‌شود، گردوی ایرانی است. اغلب گردوی ایرانی خودبارور هستند اما حالت نرپیش‌رسی دارند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۱).

۱-۴- اکولوژی مناسب گردو

به طور کلی درخت گردو خواهان آب و هوای مدیترانه‌ای است. نیاز سرمایی این گیاه ۸۰۰-۶۰۰ ساعت بین ۵ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد در طی پاییز و زمستان می‌باشد. وجود دماهای زیر صفر و یخبندان در اوایل بهار سبب سرمازدگی شاخه‌های جدید و به‌خصوص گل‌ها می‌شود. از نظر مقاومت به سرمای زمستان ارقام

^۱Juglandaceae

^۱Dichogam

^۲Protandrous

^۳Protogyneus

مختلف با هم متفاوتند. دمای هوا در ماه‌های تابستان نباید از ۳۸ درجه تجاوز نماید و یا خیلی خنک باشد، زیرا دماهای بالا سبب آفتاب سوختگی پوست سبز و سیاه شدن مغز گردو می‌شوند و دماهای پایین نیز سبب تولید میوه‌هایی می‌شود که مغز آن‌ها به مقدار کمی پر شده‌است. درختان گردو معمولاً در ارتفاع ۷۰۰ تا ۲۵۰۰ متری از سطح دریا میوه‌های بهتری تولید می‌کنند (وحدتی، ۱۳۸۲). این گونه قادر به رشد در عرض‌های جغرافیایی ۱۰ تا ۵۰ درجه شمالی بوده و به لحاظ تولید دانه خوراکی از نظر جنگلداری دارای ارزش بالایی بوده و نیز به عنوان یک درخت جنگلی دارای چوب باارزشی می‌باشد. گردو در ایران در عرض جغرافیایی ۲۹ تا ۳۹ درجه شمالی و طول جغرافیایی ۴۵ تا ۶۹ درجه شرقی به خوبی رشد می‌کند که این محدوده از دره گزو مغان در شمال کشور تا اقلید فارس در جنوب و از ارتفاعات جنوب غربی ارومیه تا کوه تفتان در جنوب شرقی را در برمی‌گیرد (احتشام نیا، ۱۳۸۸).

۱-۵-۱- ازدیاد گردو

۱-۵-۱- تکثیر جنسی

بذر: ازدیاد گردو اکثراً با کشت بذر انجام می‌گیرد اما به دلیل ناخالص بودن بذر گردو، درختان حاصل شده یک‌دست و متناجس نبوده و کمتر به پایه مادر شباهت دارند.

۱-۵-۲- تکثیر غیر جنسی

خوابانیدن، کشت بافت، قلمه، آپومیکسی (نامیزیدن) و پیوند (وحدتی، ۱۳۸۲).

بطور کلی روش پیوند بهترین راه تکثیر غیرجنسی در گردو می‌باشد. سایر روش‌های تکثیر رویشی یا به سختی جواب می‌دهند و یا به صورت تجارتي متداول نشده است. در این روش نیز به علت خروج شیره از محل زخم و ترشح ژوگلون که از فنول‌های مرکب به شمار می‌آید، موجب کاهش گیرایی پیوند و کاهش جوش خوردن پایه و پیوندک می‌شود. نتایج تحقیقات در مورد نوع پیوند متفاوت می‌باشد، برخی پیوند وصله‌ای و برخی دیگر پیوند شکمی را مناسب می‌دانند. پایه‌های بذری گردوی سیاه کالیفرنیا شمالی، گردوی سیاه شرقی و پایه پارادوکس (گردوی سیاه کالیفرنیا شمالی و گردوی ایرانی) پایه‌های رضایت-بخش برای گردوی ایرانی می‌باشند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۱).

۱-۶- ترکیبات و موارد استفاده

قسمت خوراکی گردو مغز آن می‌باشد. گردو سرشار از پروتئین‌ها، چربی‌ها، موادمعدنی و انرژی فراوان است. مقدار این مواد در مقایسه با غذاهای دیگر و نیز سایر میوه‌های خشک بسیار زیاد است. گردو حاوی ویتامین‌های گروه B بوده و از نظر ویتامین B₆ نسبت به بادام، گردوی برزیلی، بلوط، فندق، پکان غنی‌تر است. میزان ویتامین A و C در گردو بسیار کمتر است. از این رو مطالعه بر روی آن ضروری است (جلیلی مرندی و حکیمی رضایی، ۱۳۷۷).

۷-۱- ارقام و ژنوتیپ های برتر گردو در ایران و جهان

ژنوتیپ‌ها و ارقام 'RDM, Z30, Z63, Lara, Pedro, Franquette, Serr, Chandler از ژنوتیپ‌های برتر در ایران و جهان به شمار می‌آیند در این بین رقم چندلر اهمیت، سطح کشت و خصوصیات مطلوب بسزایی در صنعت کشت گردوی جهان و اخیرا ایران دارد (بی‌نام، ۱۳۸۹).

گردوی رقم چندلر

این رقم از تلاقی رقم پدر با UC ۵۶-۲۲۴ به دست آمده است و بسیاری از خصوصیات آن از لحاظ بارور بودن جوانه‌های جانبی، زمان ظهور برگ و برداشت محصول شبیه والد خود پدر می‌باشد. میوه‌های بزرگ آن بیضی شکل بوده، پوست سبز، صاف و تیره رنگی دارد. مغز آن ۴۹ درصد از وزن میوه را تشکیل می‌دهد. قدرت رشد درختان چندلر متوسط بوده، به طر نیمه‌راست رشد می‌کنند و یک رقم بسیار امیدبخش محسوب می‌شود. رقم مناسب گرده‌افشان آن RDM می‌باشد (جلیلی مرندی و حکیمی رضایی، ۱۳۷۷).

۸-۱- پراکنش گردو در جهان

طبق بررسی‌های دیرین‌شناسی گیاهی گونه‌های مختلف گردو از زمان‌های بسیار قدیم در روی کره زمین وجود داشته است اما اکثر گونه‌های آن در آسیای شرقی، خاورمیانه، دامنه کوه‌های کارپاتیان در جنوب شرقی اروپا، دامنه کوه‌های هیمالیا، شمال آفریقا و یونان، برخی ایالت‌های امریکا و شمال امریکا گسترده شده‌اند. در

¹ Ronde De Montignac

حال حاضر با توجه به اهمیت بالای این درخت و تقاضای زیادی که در بازار برای این محصول وجود دارد بسیاری از کشورها اقدام به توسعه کشت و کار گردو نموده‌اند (بی‌نام، ۱۳۹۰).

۹-۱- پراکنش گردو در ایران

به طور کلی پراکنندگی این گونه در کشور از نظر طول و عرض جغرافیایی و از نظر ارتفاع از سطح دریا بسیار وسیع است. در ایران گردو به صورت وحشی در برخی از نقاط جنگل‌های شمال ایران، در لکه‌های ناپیوسته و محدود مانند اسالم، پونل، نور، نکا، آمل و در برخی از نقاط جنگل‌های گیلان مانند ارتفاعات املش و لاهیجان به صورت درختان خودروی جنگلی با تنه نسبتاً بلند و تاج کشیده وجود دارند. این گونه در جنگل‌های شمال ایران در ارتفاعات کم تا متوسط به همراه دیگر درختان جنگلی و در بستر رودخانه‌ها و آبراهه‌ها همراه با درختان توسکا و درخت آزاد و سایر گونه‌های جنگلی یافت می‌شود. با توجه به این که گردو با شرایط متنوع آب و هوایی سازگاری دارد کشت و کار گردو برای تولید میوه نیز در اغلب استان‌ها و مناطق کشور توسعه یافته است و تمرکز کشت و کار این محصول در نواحی شمال غرب، غرب و شمال کشور می‌باشد (بی‌نام، ۱۳۹۰).

۱۰-۱- سطح زیر کشت و تولید گردو در جهان و ایران

کل سطح زیر کشت گردو در جهان ۸۶۶۰۵۹ هکتار و میزان تولید جهانی گردو بالغ بر ۲۵۴۵۳۸۸ تن در سال ۲۰۱۰ بوده که این محصول یکی از مهم‌ترین محصولات خشکباری جهان می‌باشد. کشور ایران بعد از کشورهای چین و آمریکا با سطح زیر کشت ۶۰۶۰۰ هکتار، میزان تولید ۲۷۰۳۰۰ تن و میزان عملکرد ۴۴۶۰۴ کیلوگرم در هکتار مقام سوم را در بین کشورهای تولیدکننده گردو داراست (FAO, 2010). سطح

زیرکشت و میزان تولید گردو در استان‌های مختلف در نمودار ۱-۲ آورده شده است. حداکثر سطح زیر کشت در استان کرمان و حداکثر میزان تولید در استان همدان دیده می‌شود (بی‌نام، ۱۳۹۰).